

# Tézisek

az Internal friction in enzyme reactions

Az enzimreakciók során fellépő belső súrlódás

című doktori értekezéshez

RAUSCHER ANNA ÁGNES

Témavezető: MÁLNÁSI CSIZMADIA ANDRÁS

docens, az MTA doktora

ELTE Biológia Doktori Iskola

Vezetője: Prof. ERDEI ANNA, az MTA doktora

Szerkezeti biokémia program

Vezetője: Prof. NYITRAY LÁSZLÓ, az MTA doktora

Prof. GRÁF LÁSZLÓ, az MTA doktora



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológia Intézet

Biokémiai Tanszék

2014



## Bevezetés

Az enzimreakciók általános termodinamikai jellemzésére és azok kísérletes megközelítésére empirikus paramétereket használunk, melyek leegyszerűsítik az enzimreakciók komplex energiaszínét. Ilyen régóta ismert paraméter az aktivációs energia, preexponenciális faktor, és az aktivációs entrópia is az Arrhenius és Eyring-Polányi grafikonokról, melyek az enzimreakciók kísérletesen megfigyelt hőmérsékletfüggését jellemzik. A folyadékfázisú reakciók jellemzésére Kramers súrlódási paramétert vezetett be, amely szimbolizálja a reakcióban résztvevő molekulák és környezetük között történő folyamatos energia-cserét (1, 2). Enzimreakciók esetén Kramers egyenletében a súrlódás két forrásból eredeztethető, a külső súrlódás az oldószer-molekulákhoz képest történő elmozdulásból ered, míg a belső súrlódás a fehérjemolekulán belüli átrendeződéseknek köszönhető (3). Ennek a kétféle súrlódásnak az összegét a Kramers egyenlet súrlódás tagja helyére helyettesítve az alábbi összefüggést kapjuk (3):

$$k(T, \eta) = \frac{A}{\sigma + \eta} \exp\left(\frac{-\Delta E_a}{k_B T}\right) \quad \text{Eq 1}$$

ahol az aktivációs energia,  $\Delta E_a$  és a hőmérséklet- és viszkozitásfüggetlen preexponenciális faktor,  $A$  az Arrhenius-féle hőmérsékletfüggést jellemzi. Mivel az oldat súrlódása egyenesen arányos a viszkozitásával ( $\eta$ ), a fehérjén belüli súrlódást is lehet egy

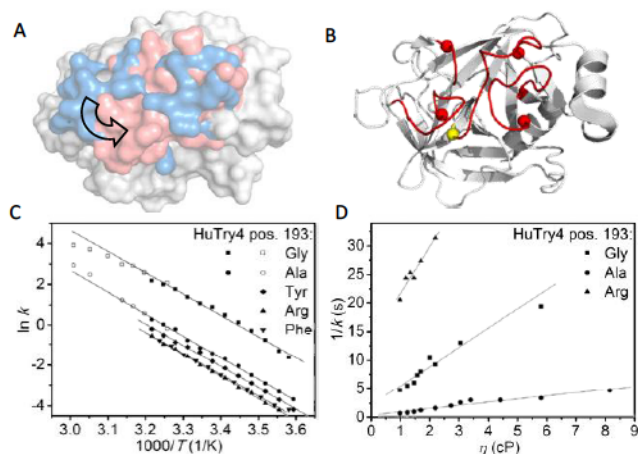
viszkozitás dimenziójú paraméterrel ( $\sigma$ ) jellemezni. Jelen kutatómunka központjában ez az Ansari és mtsi által bevezetett  $\sigma$  paraméter áll, melyet belső viszkozitásnak neveztek el (3).

### **A modell enzim – humán tripszin 4 (HuTry4)**

A szervezetben a tripszin inaktív formában, tripszinogénként expresszálódik. A tripszinogénből proteolitikus hasítással keletkezik az aktív tripszin egy konformációváltozás hatására. (1. ábra A). A zimogén és aktív formák a tripszinogén illetve tripszin stabil formái, melyek kristályszerkezete ismert (1TGN, 2PTN)(4, 5). In vitro egy hasonló, egy lépéses aktivációs reakció indítható gyors pH ugrással pH 11-ről pH 8-ra. Ez a reakció jól követhető megállított áramlásos gyorskinetikai berendezésben (stopped-flow) a Trp fluoreszcencia jelváltozás mérésével (6, 7), mely így egy kiváló kísérleti elrendezés az aktiváció során történő konformációváltozás vizsgálatához.

A tripszin aktivációjakor domén átrendeződés történik, amely során az aktivációs domén négy hurka elfordul öt glicin „csukló” (19-es, 142-es, 184-es, 193-as, 216-os aminosavak) körül (1. ábra B) (5, 6). A 193-as pozíció kivételével ezeknek a glicineknek alaninra történő cseréje erőteljesen csökkenti a tripszin proteolitikus aktivitását (8). Kollégáim felfedezték, hogy a 193-as pozícióban a glicin cseréje alaninra vagy nagyobb oldalláncú aminosavakra lassítja az aktivációs reakciót (7). A mutáció az Arrhenius görbék meredekségét nem érintette (1. ábra C), de a reakciók viszkozitásfüggését jelentősen befolyásolta (1. ábra D).

Ebből arra következtettek, hogy ennek a „csukló” pozíciónak (193Gly) a mutációja specifikusan az aktivációs reakció során fellépő belső viszkozitást ( $\sigma$ ) változtatja anélkül, hogy az enzim szerkezetét vagy aktivitását módosítaná.



**1. ábra Tripszin aktiváció: humán tripszin 4 (HuTry4)**

A) A szarvasmarha tripszin aktív (2PTN) és zimogén (1TGN) konformációban lévő egymásra vetített kristályszerkezete. Az aktivációkor az aktivációs

domén a zimogén (kék) konformációból az aktív (piros) konformációt veszi fel. B) A szarvasmarha tripszin aktív szerkezete (2PTN). Az aktivációs domén négy hurka pirossal színezett (aminosavak: 16-19, 142-152, 184-194, 216-223). A gömbök a hurkokat határoló glicinek helyét jelzik, a 193-as pozíció sárga színű. A glicineknek a hurkok átrendeződésekor csukló szerepet tulajdonítanak (5). C) A 193-as pozícióban történt aminosav cseréjének hatása a HuTry4 aktiváció Arrhenius görbéjére. D) A HuTry4 aktiváció viszkozitásfüggése. A C és D panel adatai Toth és mtsi cikkéből származnak (7).

Ezek alapján a tripszin aktiváció ideális modell az enzimreakciók során fellépő belső súrlódás vizsgálatára, mert egy jól definiált, egy lépéses reakció, egy különálló domén elfordulása néhány glicin csukló körül, valamint a mutáció a 193-as csukló pozícióban specifikusan a belső

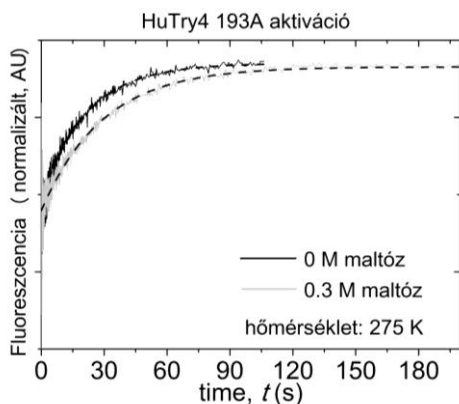
viszkozitást módosítja. Jelen vizsgálat modell enzimjei a 193A és 193G humán tripszin 4 mutánsok.

A belső viszkozitás jelenség fizikai és szerkezeti hátterének vizsgálatát tűztük ki célul. A következő tudományos kérdésekre fókuszáltunk: i) A belső viszkozitás fizikai hátterét a hőmérsékletfüggésével közelítettük meg, kísérletesen a HuTry4 aktiváció sebességi állandójának hőmérsékletfüggését és viszkozitásfüggését határoztuk meg. ii) A belső súrlódás és a fehérje szerkezeti tulajdonságai közötti összefüggést egy fontos csukló pozíció glicin-alanin cseréjével közelítettük meg, kísérletesen a humán 4-es tripszin 193-as pozíciójában történő glicin-alanin csere hatását mértük az aktivációs reakció során fellépő belső súrlódásra. iii) Végül célunk volt egy olyan összefüggő, komplex, koherens modell megalkotása, mely a megfigyeléseinket magyarázza és a belső viszkozitást összekapcsolja az energiafelszínt jellemző széles körben használt paraméterekkel.

## Módszerek

Tranziens kinetikai módszerekkel karakterizáltuk a tripszin aktiváció során zajló konformációváltozás sebességi állandóját: különböző hőmérsékletű és viszkozitású oldatokban megállított áramlásos műszerben (stopped-flow) gyors keveréssel pH ugrást hoztunk létre, amely kiváltotta a 193A és 193G HuTry4 enzimek aktivációját. Az aktiváció hatására emelkedő Trp fluoreszcencia intenzitást időben

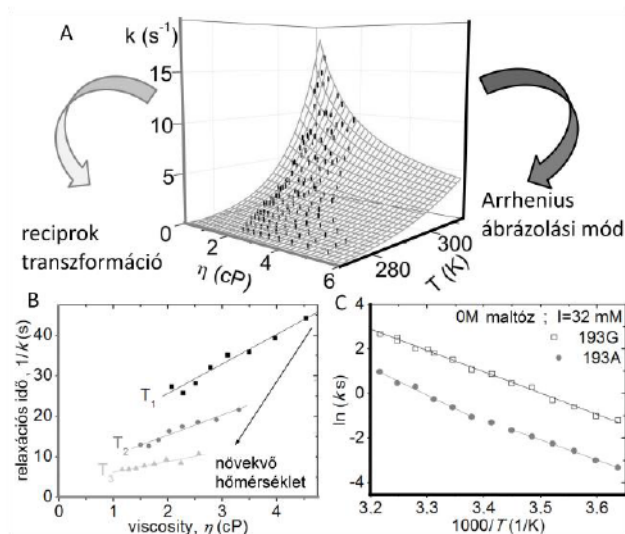
köveztük (2. ábra). A viszkozitás szabályozására maltózt használtunk, amely viszonylag kis molekulasúlyú, és a dielektromos állandó eltolásához képest arányaiban a legnagyobb a viszkozitásnövelő hatása az egyszerűbb cukrok között. Az oldatokban a maltóz koncentrációt 0-1 M között változtattuk 0,1 M-os lépésekben, amely 0,6-6 cP viszkozitást eredményezett.



**2. ábra Jellegzetes fluoreszcens jelváltozás a tripszin aktiváció során**

A 193A HuTry4 aktivációja során történő fluoreszcencianövekedés jellegzetes időbeli lefutása viszkozus közegben, maltóz jelenlétében (szürke) és maltóz nélkül (fekete). A szaggatott vonal az illesztett exponenciális lefutású görbét mutatja.

A sebességi állandókat a viszkozitás és hőmérséklet függvényében elemeztük (3. ábra). Az adatok kétváltozós analízise a mérési pontokra illeszkedő felszínt adott (3. ábra A). A viszkozitásfüggésre jól illeszkedett Eq 1 (3. ábra B), és az egyenlet alapján kiszámoltuk a belső viszkozitást minden hőmérsékleten a 193A és 193G HuTry4 enzimek aktivációjára. A sebességi állandók hőmérsékletfüggéséből klasszikus Arrhenius-görbék rajzolódtak ki (3. ábra C), amely a korábbi publikációkkal jól egyezett.



**3. ábra A változók elkülönítésével az adatok 3D szerkezete felismerhetővé válik.**

A) A 3D ábrán a 193G HuTry4 sebességi állandója a viszkozitás és hőmérséklet függvényében szerepel. Az illesztett felszín az Eq 1 and Eq 2 egyenletek kombinálásával készült. B) A sebességi állandó viszkozitásfüggése. A

mérések 275, 283 and 287K hőmérsékleten, I=32 mM ionerőn történtek a 193A HuTry4 enzimmel. C) A sebességi állandó hőmérsékletfüggése maltózmentes pufferben.

## Eredmények

**Tézis 1** A belső viszkozitás hőmérsékletfüggése Arrhenius-jellegű, a hőmérséklet reciprokától exponenciálisan függ:

$$\sigma(T) = \sigma_0 \exp\left(\frac{\Delta E_\sigma}{k_B T}\right) \quad \text{Eq 2}$$

ahol  $\Delta E_\sigma$ , a belső súrlódás aktivációs energiája a hőmérsékletfüggés karakterisztikus energiája, és  $\sigma_0$  hőmérsékletfüggetlen prefaktor.

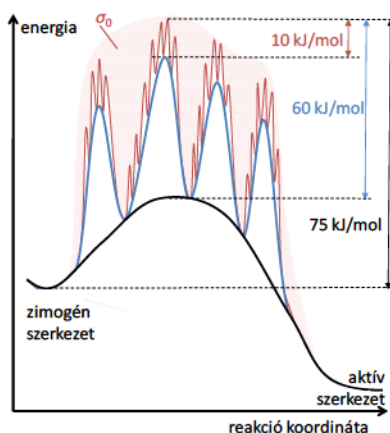
**Tézis 2** A HuTry4 enzimen a 193-as pozícióban a Gly-Ala csere megváltoztatja az aktivációs reakció belső viszkozitását, különösen a belső viszkozitás hőmérsékletfüggése változik. A 193G HuTry4 aktivációnak magasabb a belső viszkozitása, mint a 193A HuTry4 aktivációnak.



**Tézis 3** Az ionerő nem befolyásolja a HuTry4 aktiváció hőmérsékletfüggését, de megváltoztatja a viszkozitásfüggését, magasabb ionerőn erősebb viszkozitásfüggés figyelhető meg.

**Tézis 4** Modelleztük a HuTry4 aktiváció energiagátját, amelyben a gát hierarchikus szerkezete felelős a belső súrlódásért. (4. ábra)

**Tézis 5** Szisztematikus hőmérséklet- és viszkozitásfüggési adatok alapján izoviskózus, állandó viszkozitású közegre számítottuk ki az Arrhenius-görbéket, melyeknek meredekségét ezáltal nem befolyásolja az oldószer viszkozitásának hőmérsékletfüggése.



**4. ábra A HuTry4 aktiváció energiagátja.**

A HuTry4 193A/G enzim zimogénből aktív formába váltását jellemzi a reakció koordináta. Két szintű tagoltság jelenik meg, melyek a flexibilitástól függően a belső súrlódás energiagátjának feleltethetők meg (Eq 2). Az árnyékolás szimbolizálja a reakciókoordináta mentén fellépő súrlódást.

## Következtetések

A munka három kérdéskörre fókuszált: i) Mit tanulhatunk az empirikusan bevezetett belső viszkozitás fizikai háttéréről a hőmérsékletfüggése alapján? ii) Mi a kapcsolat a belső súrlódás és az enzimek szerkezeti tulajdonságai között? iii) Hogyan

modellezhetjük a reakciók viszkozitás- és hőmérsékletfüggésére vonatkozó megfigyeléseinket, hogyan viszonyul a belső súrlódás az energiagát jellegzetes paraméteréhez?

Azt tapasztaltuk, hogy a belső viszkozitásnak Arrhenius-jellegű a hőmérsékletfüggése, ami jelzi, hogy a folyadékok viszkozitásához vagy a súrlódáshoz hasonlóan energiagáthoz kapcsolódik. Korábbi hőmérséklet- és viszkozitásfüggést tartalmazó publikációk adatainak elemzése során kiderült, hogy a belső viszkozitás hőmérsékletfüggésére vonatkozó megfigyeléseink érvényesek több, akár különböző időskálán játszódó reakcióra is. Megfigyeltük, hogy az enzim belső súrlódása nőtt a flexibilitás növelésével, míg az Arrhenius görbéből számolt energiagát változatlan maradt. Ezalapján létrehoztunk egy elasztikusan kapcsolt, párhuzamos koordinátákból álló modellt, amely magyarázza a kapcsolatot az energiagát hierarchikus szerkezete, a flexibilitás és az enzimek belső súrlódása között. Ezenkívül feloldottunk két ellentmondást: i) Megkülönböztettük a nagy amplitúdójú mozgással jellemezhető flexibilitást az elasztikussággal jellemezhető flexibilitástól és megmagyaráztuk, miért reagálnak ellentétesen a viszkozitás változására. ii) A modellünk magyarázza, hogy azonos energiagát mellett miért gyorsabb a flexibilisebb enzim, melynek nagyobb a belső viszkozitása.

## Kapcsolódó publikációk

Rauscher AA, Simon Z, Szollosi GJ, Graf L, Derenyi I, Malnasi-Csizmadia A

Temperature dependence of internal friction in enzyme reactions

FASEB J 25: (8)2804-2813 (2011)

Rauscher A, Derenyi I, Graf L, Malnasi-Csizmadia A

Internal friction in enzyme reactions

IUBMB LIFE 65: (1)35-42 (2013)

1. Kramers, H. A. (1940) Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions, *Physica* 7, 284-304.
2. Hänggi, P., Talkner, P., Borkovec, M. (1990) Reaction-rate theory: fifty years after Kramers, *Reviews of Modern Physics* 62, 251-342.
3. Ansari, A., Jones, C. M., Henry, E. R., Hofrichter, J., Eaton, W. A. (1992) The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes, *Science* 256, 1796-1798.
4. Kossiakoff, A. A., Chambers, J. L., Kay, L. M., Stroud, R. M. (1977) Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution, *Biochemistry* 16, 654-664.
5. Walter, J., Steigemann, W., Singh, T. P., Bartunik, H., Bode, W., et al. (1982) On the Disordered Activation Domain in Trypsinogen. Chemical Labelling and Low-Temperature Crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. B* 38, 1462-1472.
6. Verheyden, G., Matrai, J., Volckaert, G., Engelborghs, Y. (2004) A fluorescence stopped-flow kinetic study of the conformational activation of alpha-chymotrypsin and several mutants, *Protein Sci.* 13, 2533-2540.
7. Toth, J., Simon, Z., Medveczky, P., Gombos, L., Jelinek, B., et al. (2007) Site directed mutagenesis at position 193 of human trypsin 4 alters the rate of conformational change during activation: role of local internal viscosity in protein dynamics, *Proteins* 67, 1119-1127.
8. Gombos, L., Kardos, J., Patthy, A., Medveczky, P., Szilagyi, L., et al. (2008) Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin: the role of glycine hinges, *Biochemistry* 47, 1675-1684.